

Institut für Veterinärbakteriologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. M. M. Wittenbrink

**Etablierung einer Western Blot-Analyse zum Nachweis von
Mycoplasma suis-Infektionen beim Schwein**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Petra Fischer
Tierärztin
aus Wolfratshausen (D)

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Max M. Wittenbrink, Referent
Prof. Dr. Karl Heinritzi, Korreferent

Zürich 2003

Meinen Eltern und Nik

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
4	Material und Methoden	10
4.1	Versuchstiere	10
4.1.1	Zeitplan der Tierhaltung	10
4.2	Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen	12
4.3	Blutausstriche	12
4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	13
4.4.1	PCR zum Nachweis von <i>Mycoplasma suis</i>	13
4.4.2	Analyse von PCR-Produkten durch Agarose-Gel-Elektrophorese	13
4.5	Aufreinigung von <i>Mycoplasma suis</i> -Antigen aus Blut	14
4.6	Immunisierung eines Kaninchens mit <i>Mycoplasma suis</i>	15
4.7	Reinigung von Kaninchen-anti- <i>Mycoplasma suis</i> -IgG durch Protein-A-Affinitätschromatographie	15
4.8	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	16
4.9	Western Blot-Analyse	17
4.10	Überprüfung der Antigen-Reaktivität mit einem POD-konjugierten Kaninchen anti-Schwein Sekundärantikörper	18
4.11	Überprüfung der Antigen-Reaktivität mit verschiedenen POD-konjugierten Sekundärantikörpern	19
4.12	Serologische Untersuchung von Schweinen auf Antikörper gegen <i>Mycoplasma suis</i> mittels Western Blot-Analyse	19
4.13	Untersuchung der Spezifität der Western Blot-Analyse	20
4.14	Geräte	20
4.15	Computerprogramme	21
5	Ergebnisse	22
5.1	Ergebnisse der klinischen Untersuchung und allgemeinen Labordiagnostik	22
5.2	Nachweis der <i>Mycoplasma suis</i> -Infektion mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	22

5.3	Herstellung und Charakterisierung des anti- <i>Mycoplasma suis</i> -Kaninchen-Hyperimmunserums	23
5.4	Etablierung einer Western Blot-Analyse zum Nachweis von <i>Mycoplasma suis</i> -spezifischen Antikörpern in Schweineseren	23
5.5	Reaktivität von <i>Mycoplasma suis</i> -Antigen mit verschiedenen POD-konjugierten Sekundärantikörpern	24
5.6	Serologische Untersuchung von Schweinen auf Antikörper gegen <i>Mycoplasma suis</i> mittels Western Blot-Analyse	24
5.7	Spezifität der Western Blot-Analyse	25
6	Diskussion	26
7	Tabellen und Abbildungen	30
8	Abkürzungsverzeichnis	38
9	Literaturverzeichnis	40

1 Zusammenfassung

M. suis, der Erreger der Eperythrozoonose ist in vitro nicht kultivierbar. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Western Blot-Analyse zum Nachweis von Antikörpern gegen *M. suis* entwickelt. Serumproben eines unter definierten Versuchsbedingungen gehaltenen Tierkollektivs (nicht infizierte, nicht infizierte und splenektomierte, experimentell infizierte, experimentell infizierte und splenektomierte Schweine) wurden mit diesem Nachweisverfahren untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Erreger aus ungerinnbar gemachtem Blut experimentell infizierter und splenektomierter Schweine aufgereinigt. Im ersten Schritt wurde ein Kaninchen mit dieser Antigenpräparation immunisiert und ein affinitätschromatographisch aufgereinigtes anti-*M. suis*-Kaninchen-Hyperimmunserum gewonnen. Bei der Charakterisierung dieses anti-*M. suis*-Kaninchen-Hyperimmunserums mittels Western Blot-Analyse zeigten sich zwei *M. suis*-spezifische Banden mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und 77 kDa. Die Etablierung der Western Blot-Analyse zum Nachweis von *M. suis*-spezifischen Antikörpern in Schweineseren erfolgte durch Inkubation von *M. suis*- und Kontrollpräparationen sowohl mit definiertem negativem als auch mit definiertem positivem Schweineserum. Auch hier liessen sich die beiden immunreaktiven Proteine mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und 77 kDa nachweisen. Untersuchungen der Serumproben des Tierkollektivs erbrachten einen sicheren Nachweis bei allen infizierten und splenektomierten Tieren nach akuter Eperythrozoonose. Bei sechs von sieben latent infizierten Trägartieren ergab die Western Blot-Analyse ebenfalls ein positives Ergebnis. Alle Serumproben der Kontrollgruppe wurden negativ getestet.

Die mittels Western Blot durchgeführte Proteinanalyse von *M. suis* und der erstmalige Nachweis von *M. suis*-spezifischen Partialantigenen dient als Grundlage für weiterführende immunologische Studien.

2 Summary

M. suis, the causative agent of eperythrozoonosis cannot be cultured in vitro. In the present study, a western blot analysis was developed for the detection of antibodies against *M. suis*. Serum samples from test animal groups kept under defined experimental conditions (non-infected, non-infected and splenectomized, experimentally infected, experimentally infected and splenectomized) were investigated using this procedure. For this purpose, the infectious agent was isolated from the uncoagulable blood of experimentally infected and splenectomized pigs. In the first stage, a rabbit was immunized with antigen and anti-*M. suis*-rabbit-hyperimmune serum isolated via affinity chromatography. In the typification of the anti-*M. suis*-rabbit-hyperimmune serum using western blot analysis, two *M. suis*-specific bands were observed having molecular weights of 45 kDa and 77 kDa. Western blot analysis was established for the detection of *M. suis*-specific antibodies in pig sera by incubating *M. suis*- and control samples with defined negative as well as defined positive pig serum. Here, too, both of the immunoreactive proteins were detected, having molecular weights of 45 kDa and 77 kDa. In an assessment of serum samples from the animal groups, conclusive detection was attained in all infected and splenectomized animals following acute eperythrozoonosis; in six out of seven latently infected carrier animals, the western blot analysis was also positive. All serum samples of the control group tested negative.

The protein analysis of *M. suis* using the western blot and the first-time detection of *M. suis*-specific partial antigens may serve as a basis for future immunologic investigation to more accurately characterize the infective agent.

3 Einleitung

Mycoplasma (M.) suis ist der Erreger der porcinen Eperythrozoonose, einer Faktorenkrankheit beim Schwein (HEINRITZI, 1989).

M. suis ist ein rundliches Bakterium von 0,5 bis 0,8 µm Durchmesser, das in vitro nicht kultivierbar ist und früher als *Eperythrozoon (E.) suis* der Familie *Anaplasmataceae* in der Ordnung *Rickettsiales* klassifiziert war (RIKIHISA et al., 1997). Während *Anaplasma* spp. in die Erythrozyten eindringen, heften sich die Eperythrozoen an die Zelloberfläche (NEIMARK et al., 2001). Im Gegensatz zu *Anaplasma* spp. sind sie von einer einfachen Membran umgeben (POSPISCHIL und HOFFMANN, 1982).

Vergleiche von Sequenzanalysen des 16S rRNA-Gens von *E. suis* mit *Haemobartonella (H.) muris*, *H. felis* und *Mycoplasma* spp. liessen die Vermutung zu, dass *Haemobartonella* spp. und *E. suis* nahe verwandt mit der Familie *Mycoplasmataceae* sind (RIKIHISA et al., 1997). Aufgrund dieser phylogenetischen Zugehörigkeit wurde *E. suis* der Gattung *Mycoplasma* zugeordnet und es erfolgte die Reklassifizierung als eine separate neue Spezies *Mycoplasma suis* comb. nov. (NEIMARK et al., 2001; MESSICK et al., 2002).

M. suis wird vermutlich hämatogen durch Arthropoden (Schweinelaus *Hämatopinus suis* und Räude milbe *Sarcoptes suis*) übertragen (HEINRITZI, 1990b). Eine iatrogene Infektion, z.B. durch kontaminierte Injektionskanülen, kontaminiertes Operationsbesteck und Oberkieferschlingen, ist möglich. Orale Infektionen wurden von HEINRITZI (1990b) beschrieben.

Die Eperythrozoonose verläuft in der Regel subklinisch (HEINRITZI et al., 1984). Zum Krankheitsausbruch kommt es vor allem unter Belastung wie Geburt, Umstallen, Absetzen, bei schlechten Haltungs- und Fütterungsbedingungen oder als Komplikation anderer Infektionskrankheiten (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1989; SMITH, 1992; GRESHAM und ROGERS, 1994). Da *M. suis*-Infektionen das Auftreten anderer Infektionskrankheiten begünstigen, werden sie als Faktorenkrankheit bezeichnet (HENRY, 1979; HEINRITZI, 1989).

Die akute Eperythrozoonose tritt bevorzugt bei Absatzferkeln, Läufer- und Mastschweinen auf. Das Krankheitsbild wird bestimmt von einer hämolytischen Anämie mit Blässe, Ikterus und je nach Schweregrad Apathie, Anorexie, Dyspnoe und Fieber bis 42 °C. Die erkrankten Tiere zeigen zyanotische Veränderungen an den Akren, bevorzugt an den Rändern der Ohrmuscheln, die durch Thrombosierung der Kapillaren in den Akren zustande kommen (HEINRITZI, 1990a). Hierfür werden Kälteagglutinine verantwortlich gemacht, die bei Temperaturen unterhalb der Körpertemperatur die Erythrozyten agglutinieren (BROWN und COLLING, 1982; COLLING et al., 1983). Die Eperythrozoonose wird deshalb auch den durch Kälteagglutinine vermittelten autoimmunhämolytischen Anämien (AIHA) zugeordnet.

Da *M. suis* in vitro nicht kultivierbar ist, ist über die mikrobiellen sowie immunologischen Eigenschaften des Erregers bisher wenig bekannt. Nach Infektion mit *M. suis* lagern sich die Erreger einzeln oder in Ketten an der Erythrozytenoberfläche an und können den gesamten Erythrozyten ummanteln (LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass sich *M. suis* mit einem Abstand von 30 nm an die Erythrozytenmembran anheftet. Die Anlagerungsstelle weist eine Eindellung und Verdichtung auf, die sich auch bei Erythrozyten zeigt, die nach einer Tetrazyklinbehandlung frei von *M. suis*-Organismen sind (ZACHARY und BASGALL, 1985). Zwischen den Erregern und der Erythrozytenmembran sind feine Fibrillen zu sehen (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Untersuchungen deuten darauf hin, dass *M. suis* nicht durch das Eindringen in die Erythrozyten zu einer intravaskulären Hämolyse führt (POSPISCHIL und HOFFMANN, 1982; LIEBICH und HEINRITZI, 1992), sondern bleibende Membranveränderungen hervorruft, die wahrscheinlich einen extravaskulären Abbau in Form einer Erythrozytenphagozytose bedingen (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Es wird postuliert, dass durch diese Membranveränderungen verborgene Strukturen mit antigenem Charakter auf den Erythrozyten freigelegt und vom körpereigenen Immunsystem als Fremdanigene angesehen werden (ZACHARY und BASGALL, 1985; ZACHARY und SMITH, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Diese könnten als Stimulus für die Synthese der Kälteagglutinine dienen (ZACHARY und SMITH, 1985). Die Autoantikörper binden bei sinkenden Temperaturen an die veränderten Erythrozytenmembranen und führen daher vor allem in den Akren zur Agglutination der befallenen roten Blutkörperchen. Bei höheren Temperaturen sind die Kälteagglutinine von der Erythrozytenmembran wieder ablösbar. SCHMIDT et al. (1992) konnten die Kälteagglutinine als Immunglobuline vom Typ M (IgM) identifizieren.

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass Kälteagglutinine die Fähigkeit besitzen Komplementfaktoren zu binden. Bei ansteigenden Temperaturen kommt es zur Ablösung der IgM-Antikörper, zur Aktivierung der Komplementkaskade und damit zur Phagozytose der befallenen Erythrozyten. Ein ähnlicher Mechanismus ist wahrscheinlich für die schwere Anämie verantwortlich, die bei der akuten porcinen Eperythrozoonose auftritt (ZACHARY und SMITH, 1985). Bei der Infektion des Menschen mit *M. pneumoniae*, einer mit dem akuten Kälteagglutinin-Syndrom einhergehenden Erkrankung, zeigte sich, dass die mit *M. pneumoniae* assoziierten Kälteagglutinine sich nicht gegen *M. pneumoniae* richteten (ZACHARY und SMITH, 1985). Ebenso scheinen sich die Kälteagglutinine zu verhalten, die bei einer akuten Eperythrozoonose gebildet werden (ZACHARY und BASGALL, 1985). *M. suis* entzieht sich dem porcinen Immunsystem, indem es die humorale Immunantwort gegen vom Erreger besetzte Erythrozyten fehlleitet (ZACHARY und SMITH, 1985). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass auch die Funktion der T-Lymphozyten durch den Erreger

unterdrückt wird und keine Gedächtniszellen gebildet werden (ZACHARY und SMITH, 1985). Die chronische Form der Eperythrozoonose führt zu Kümern, Blässe und gelegentlich zu allergischen Hautreaktionen, die sich als Urtikaria oder Morbus maculosus manifestieren (HEINRITZI, 1990a). Sie wird häufig von bakteriellen Sekundärinfektionen und Parasitosen begleitet (BOLLWAHN, 1982). Eine ursächliche Beteiligung von *M. suis* an Reproduktionsstörungen wird diskutiert (BROWNBACK, 1981; ROSENKRANS et al., 1984). Genaue Aussagen über die Morbidität sind wegen des meist latenten Verlaufs in infizierten Beständen nicht möglich, je nach Autor wird sie zwischen 10% und 60% angegeben (KINGSLEY und HIBBS, 1968; MÜLLER und NEDDENRIEP, 1979, KLOSTER et al., 1987). Die Letalität innerhalb eines Bestandes wird zwischen 1% und 30% angegeben (QUINN, 1938; ROBB, 1943).

Die klinische Diagnose Eperythrozoonose kann nur in akuten Krankheitsfällen sicher gestellt werden (HEINRITZI, 1990a). Die ätiologische Diagnose erfolgt durch den fluoreszenzmikroskopischen Erregernachweis im Blutaussstrich nach Färbung mit Akridinorange (KREIER und GOTHE, 1976). Dieses Verfahren ist nur bei Tieren mit einem akuten hämolytischen Anfall aussagekräftig. *M. suis* lassen sich als hell- bis dunkelorange rundliche bis ovale Strukturen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 0,8 µm am Rand der Erythrozyten oder frei im Plasma liegend erkennen (HEINRITZI, 1990a, 1990b; LIEBICH und HEINRITZI, 1992).

Hämatologische Untersuchungen können zur Absicherung der Diagnose mit herangezogen werden. Bei der akuten Eperythrozoonose ist das Blut oft dünnflüssig und lackfarben. Teilweise tritt eine Spontanagglutination der Erythrozyten auf (HEINRITZI, 1990a; SCHMIDT et al., 1992). Aus diesem Grund sollte das zu untersuchende Blut vor dem Ausstreichen auf 38 °C angewärmt werden, weil sonst infolge der Erythrozytenagglomeration die Mykoplasmen nur schwer erkennbar sind (HEINRITZI, 1990a).

Während der *M. suis*-Bakteriämie sind eine normochrome und normozytäre Anämie sowie eine neutrophile Leukozytose nachweisbar (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1984a, 1990a). Das rote Blutbild weist einen nahezu parallel verlaufenden Abfall der Erythrozytenzahl sowie der Hämoglobin- und Hämatokritwerte auf (HEINRITZI, 1990a). Die Glukosekonzentration im Serum ist stark vermindert (PETERANDERL, 1988; HEINRITZI et al., 1990; SMITH et al., 1990). Die Bilirubinkonzentration steigt während der hämolytischen Phase im Blutserum an (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1984a).

Die bisher einzigen sicheren Nachweisverfahren, durch die auch subklinische *M. suis*-Infektionen erfasst werden können und die deshalb als Goldstandard gelten, sind die Splenektomie des fraglich infizierten Einzeltieres oder die experimentelle Übertragung von Blut verdächtiger Tiere auf splenektomierte, nicht infizierte Schweine. Innerhalb von sechs bis 14 Tagen tritt das Erscheinungsbild der akuten Eperythrozoonose auf. Eine Erklärung für

die plötzliche Vermehrung der Erreger nach Splenektomie ist in der nun fehlenden Filterfunktion der Milz zu vermuten. Bei fehlender Milz können die befallenen Erythrozyten nicht mehr in ausreichendem Mass eliminiert werden, was den Mykoplasmen die Gelegenheit zur massenhaften Vermehrung bietet (HEINRITZI, 1990b). Dieser biologische Test ist für die Routinediagnostik jedoch nicht geeignet.

Für die Diagnostik von Infektionserregern, die nur sehr schwer oder - wie *M. suis* - nicht kultiviert werden können, stellen Verfahren zum Nachweis bzw. zur Amplifizierung von erregerspezifischer DNA und serologische Methoden eine erhebliche Verbesserung dar. Für die Etablierung und Validierung dieser Nachweisverfahren werden reine Erreger-DNA bzw. hochreine Antigenpräparationen (Ag-Präparationen) benötigt, die üblicherweise aus Reinkulturen des untersuchten Erregers gewonnen werden. Ausgangsmaterial für partiell gereinigte *M. suis*-Suspensionen ist das hochgradig erregerhaltige Blut von akut kranken Schweinen, aus dem die an Erythrozyten anhaftenden *M. suis*-Partikel abgetrennt und aufgereinigt werden müssen, ohne dass eine Separierung des Erregers von der flüssigen und zellulären Blutmatrix bislang vollständig gelungen ist. Aus diesen Gründen sind *M. suis*-Referenz-DNA bzw. *M. suis*-Suspensionen stets mit Residuen aus der Blutmatrix kontaminiert und stehen aufgrund der aufwendigen Gewinnung nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung.

Im Jahr 1990 gelang erstmals die Isolierung von Gesamt-*M. suis*-DNA, mit deren Hybridisierung eine Detektion von *M. suis*-DNA im Vollblut experimentell infizierter Schweine möglich war (OBERST et al., 1990a). Als problematisch erwies sich, dass die DNA, die aus experimentell infizierten Schweinen gewonnen wurde, in der Quantität abhängig von der Schwere der Bakteriämie variierte. Eine Standardisierung war daher nicht möglich. Mittels verdauter *M. suis*-DNA konnte eine Gendatenbank erstellt werden (OBERST et al., 1990b). Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter *M. suis*-DNA konnte hieraus ein *M. suis*-spezifischer rekombinanter Klon (KSU-2) identifiziert werden. Die Intensität der Hybridisierung war weiterhin abhängig von der Anzahl der *M. suis*-Organismen im Blut, jedoch konnte auch noch acht Monate nach Behandlung mit Tetrazyklinen ein positiver Nachweis erbracht werden (OBERST et al., 1990b).

Um die Sensitivität zu steigern, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) entwickelt. Dazu wurden DNA-Sequenzen des KSU-2-Klons als *M. suis*-spezifische Primer verwendet, um *M. suis*-DNA aus dem Blut infizierter Schweine zu amplifizieren. Das Amplifikat hatte eine Länge von 492 Basenpaaren (bp) (GWALTNEY et al., 1993). Durch Hybridisierung des Amplifikats mit dem KSU-2-Klon als Sonde war bereits 24 Stunden post infectionem (p.i.) im Blut splenektomierter Schweine ein positiver Nachweis möglich. Die PCR konnte genomische *M. suis*-DNA ab 450 pg amplifizieren, was etwa 5000 *M. suis*-Organismen entspricht (GWALTNEY et al., 1993).

Durch eine Verbesserung des PCR-Protokolls konnte *M. suis*-DNA auch im Blut experimentell infizierter, nicht splenektomierter Schweine detektiert werden (GWALTNEY und OBERST, 1994). In der Studie wurde bei zwei der vier Schweine bereits vor der experimentellen Infektion *M. suis*-DNA amplifiziert, was auf eine latente natürliche Infektion schließen liess, welche in Screening-Tests (Blutausstrich und/oder Indirekte Hämagglutination) nicht erkannt worden war.

Andere Arbeitsgruppen arbeiteten mit dem 16S rRNA-Gen. Phylogenetische Analysen, basierend auf diesem Gen, zeigten eine engere Verwandtschaft von *M. suis* und *Haemobartonella* spp. zu *Mycoplasma* spp. als zu *Anaplasma marginale* (RIKIHISA et al., 1997). In einer weiteren Studie wurde dieses Gen kloniert, sequenziert und bekannte hypervariable Regionen zur Entwicklung *M. suis*-spezifischer Primer verwendet (MESSICK et al., 1999). Mit einer Nachweisgrenze zwischen 47 und 658 fg konnte eine Verbesserung der Sensitivität im Vergleich zum PCR-Protokoll von GWALTNEY et al. (1993) erzielt werden.

Ein neueres PCR-Protokoll mit Primern gegen ein 1,8-kb-*EcoRI*-Fragment aus dem *M. suis*-Genom zeigte mit etwa 400 *M. suis*-Partikeln pro Reaktionsansatz eine vergleichbare Sensitivität (HÖLZLE et al. 2000, 2003). Das *M. suis*-spezifische PCR-Produkt konnte sowohl aus Blutproben, die während einer akuten Eperythrozoonose entnommen wurden, als auch aus Blutproben latent infizierter Tiere amplifiziert werden. Daher ist diese PCR geeignet für die Detektion latent infizierter Trägartiere.

Neben den molekularbiologischen wurden auch serologische Verfahren zum Nachweis von *M. suis* entwickelt, die sich bisher jedoch nicht in der Routineuntersuchung etablieren konnten. Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde erstmals von SPLITTER (1958) angewandt, um die im Labor gestellte Verdachtsdiagnose einer akuten Eperythrozoonose zu bestätigen. Ein bis sieben Tage nach Auftreten klinischer Symptome und bei wiederholt auftretenden Krankheitssymptomen wurde die KBR positiv, allerdings nur für ca. 14-21 Tage. Milde Verlaufsformen bei experimentell infizierten, nicht splenektomierten Tieren konnten nicht sicher erkannt werden. Trägartiere wurden generell negativ getestet. Zusätzlich kam es zu einer nicht spezifischen positiven Reaktion mit bovinem Anaplasmen-Antigen sowie mit bovinen Erythrozyten bei einem Grossteil der Seren akut erkrankter Schweine, so dass von einer Reaktion mit den Erythrozyten und nicht mit den Anaplasmen auszugehen war (SPLITTER, 1958). Infizierte splenektomierte Schweine erreichten in der KBR höhere Antikörpertiter (Ak-Titer) als infizierte nicht splenektomierte Tiere. Dies wird auf eine Abhängigkeit von der Erregervermehrung und der Ausbildung der Antikörper (Ak) im Tier zurückgeführt. Positive KBR-Titer konnten hierbei bis zum Versuchsende am 56.-60. Tag p.i. nachgewiesen werden (SCHULLER et al., 1990).

Die Indirekte Hämagglutination (IHA) wurde als Verbesserung zur KBR angesehen, weil mit diesem Testsystem auch Trägartiere erkannt wurden (SMITH und RAHN, 1975). Allerdings wurden in dieser Studie nur splenektomierte Tiere untersucht. Nicht splenektomierte, latent infizierte Tiere ohne hämolytischen Anfall hatten in der IHA keine oder nur sehr geringe Ak-Titer (BALJER et al., 1989). Erst nach klinisch manifester Erkrankung kam es zu einem Anstieg des Ak-Titers, der über zwei bis drei Monate persistierte und anschließend wieder abfiel. Jeder neue klinische Anfall löste eine erneute Ak-Produktion aus, so dass bei infizierten Tieren ein charakteristischer wellenförmiger Verlauf der Ak-Titer festzustellen war (BALJER et al., 1989). Die für eine Infektionskrankheit atypisch kurzzeitige Ak-Persistenz wurde damit erklärt, dass IgM-Kälteagglutinine nachgewiesen wurden, die in zeitlicher Abhängigkeit von einer *M. suis*-Bakteriämie auftreten und nicht bereits zum Zeitpunkt der Infektion gebildet werden. Es gab keine Hinweise für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Daher sind bei Untersuchungen mit der IHA immer wieder falsch negative Ergebnisse zu erwarten. In Bestandsuntersuchungen von 16 Zuchtbetrieben wurde mit der IHA kein falsch positiver Befund erhoben.

Im Vergleich zur IHA wurde eine höhere Sensitivität des ELISA beschrieben (HSU et al., 1992), weil vermutlich im ELISA die leichten Ketten aller Immunglobuline detektiert werden, während in der IHA vorwiegend IgM nachgewiesen wird.

Durch die Lyse der Erythrozyten während der Aufreinigung des *M. suis*-Antigens waren Teile der Erythrozytenmembranen in der Antigenpräparation enthalten. Dies führte in der Studie von HSU et al. (1992) wahrscheinlich zu unspezifischen Immunreaktionen. In einer weiteren Studie erfolgte die Aufreinigung des *M. suis*-Antigens nach der Methode von SPLITTER (1958) (SCHULLER et al., 1990). Hierbei wurden die Erreger nicht von den Erythrozytenmembranen getrennt. Durch Präadsorption der zu untersuchenden Seren mit Schweineerythrozyten sollte vielmehr verhindert werden, dass es zu einer unspezifischen Reaktion der im Serum enthaltenen IgM-(Kälteagglutin)-Antikörper mit der in den Ag-Präparationen vorhandenen Erythrozyten kommt (SCHULLER et al., 1990). Auch im ELISA zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen Titeranstieg und Bakteriämie. So wiesen die Seren splenektomierter Schweine im Gegensatz zu nicht splenektomierten Tieren deutlich höhere Ak-Titer auf.

Ein wichtiges Kriterium für die Sensitivität und Spezifität eines serologischen Nachweisverfahrens ist die möglichst hohe Aufreinigung der Ag-Präparationen, die aufgrund des Auftretens von Autoantikörpern frei von Erythrozytenmembranbestandteilen sein sollten. Bei der Isolation der *M. suis*-Organismen nach der Methode von HALL et al. (1988) werden diese durch Zusatz von EDTA von den nicht lysierten Erythrozytenmembranen getrennt. Man erhält eine Präparation, die frei von Erythrozyten, Erythrozytenmembranen, Leukozyten, Thrombozyten und den meisten Blutproteinen ist.

Nachteil der vorangehend beschriebenen serologischen Methoden ist, dass chronisch infizierte Trägartiere nicht erkannt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Entwicklung eines serologischen Screening-Verfahrens für die Bestandsdiagnostik, das den Nachweis von latent *M. suis*-infizierten Schweinen ermöglicht.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Der Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 211-2531-77/98 genehmigt.

Für die Untersuchungen standen Schweine der Rasse Pietrain x Deutsche Landrasse (Masthybride) zur Verfügung.

Die Schweine wurden bei der Aufstallung einer klinischen Untersuchung unterzogen. Am Tag der Aufstallung hatten die Tiere ein Durchschnittsgewicht von 29,2 kg (26,0-34,5 kg). Die Haltung erfolgte in Einzelboxen mit planbefestigtem Boden und Stroheinstreu. Die Raumtemperatur (RT) betrug 16-18°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70%. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich mit einem pelletierten Alleinfutter. Trinkwasser wurde ad libitum angeboten. Über die gesamte Versuchsdauer wurde täglich morgens und abends nach der Fütterung die rektale Temperatur gemessen.

- Gruppe A: Sieben Schweine (01/99, 02/99, 03/99, 04/99, 05/99, 06/99, 07/99), mit *Mycoplasma (M.) suis* experimentell infiziert, splenektomiert und zur Gewinnung von *M. suis*-Antigen verwendet
- Gruppe B: Sieben Schweine (11/99, 12/99, 13/99, 14/99, 15/99, 16/99, 17/99), nicht infiziert (frei von *M. suis*), splenektomiert und zur Gewinnung von Kontrollantigen verwendet
- Gruppe C: Ein Schwein, *M. suis* positiv, für die Infektion der Gruppe A, Positivkontrolle für die Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Gruppe D: Ein Schwein, frei von *M. suis*, Negativkontrolle für die PCR
- Gruppe E: Ein Schwein, zur Gewinnung von negativem Schweineserum, experimentell infiziert mit *M. suis*, splenektomiert, zur Gewinnung von positivem Schweineserum (für die Etablierung einer Western Blot-Analyse)

4.1.1 Zeitplan der Tierhaltung

Gruppe A und E:

- Tag 0 Aufstallung, Blutentnahme aus der *Vena (V.) cava cranialis* bzw. *V. jugularis* zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutausstrich und PCR
- Tag 1-42 Wöchentliche Blutentnahme zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutausstrich und PCR

- Tag 43 Blutentnahme, anschliessend experimentelle Infektion mit *M. suis* durch die Injektion von 2 ml EDTA-Blut eines natürlich infizierten Schweines, das sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im akuten Anfall befand, Injektion subkutan am Ohrgrund
- Tag 44-106 Wöchentliche Blutentnahme zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutaussstrich und PCR
- Tag 107 Splenektomie (Methode nach HEINRITZI, 1984b)
- ab Tag 107 Wöchentliche Blutentnahme zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutaussstrich und PCR, zusätzlich im akuten Anfall Entnahme von bis zu 200 ml Blut aus der *V. cava cranialis* bzw. *V. jugularis* zur Gewinnung von *M. suis*-Antigen
- Gruppe B:
- Tag 0 Aufstallung, Blutentnahme aus der *V. cava cranialis* bzw. *V. jugularis* zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutaussstrich und PCR
- Tag 1-55 Wöchentliche Blutentnahme zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutaussstrich und PCR
- Tag 56 Splenektomie (Methode nach HEINRITZI, 1984b)
- ab Tag 56 Wöchentliche Blutentnahme zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutaussstrich und PCR

Nach einer Blutentnahme zum Zeitpunkt der Aufstallung erfolgte über einen Zeitraum von ca. sechs Wochen eine wöchentliche Blutentnahme aus der *V. cava cranialis* bzw. *V. jugularis* zur Kontrolle des Gesundheitsstatus mittels Blutaussstrich und PCR. Es wurden Serummonovetten® (Sarstedt, Nümbrecht, D) mit aufgesetzten Einmalkanülen von 50-120 mm Länge (Sterican®, Braun, D; TSK-Supra, TSK, Tochigi, Japan) verwendet. Unmittelbar nach der Entnahme von ca. 10 ml Blut wurden 1-2 ml in ein mit EDTA beschichtetes Kunststoffröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, D) umgefüllt. Das Serum wurde durch Zentrifugieren der Serummonovetten® gewonnen (10 min, 3000 rpm, Rotixa/AP-Zentrifuge, Hettich).

43 Tage nach der Aufstallung erfolgte die experimentelle Infektion mit *M. suis* durch Übertragung von EDTA-Blut eines natürlich infizierten Schweines, das sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im akuten Anfall befand. Den Tieren aus Gruppe A wurden 2 ml von diesem Blut subkutan am Ohrgrund injiziert.

Am 64. Tag nach der Infektion wurde bei den Schweinen der Gruppe A eine Splenektomie nach der Methode von HEINRITZI (1984b) durchgeführt. Nach Infektion und Splenektomie wurden den Tieren aus Gruppe A, zusätzlich zu den wöchentlichen Blutentnahmen, im

akuten Krankheitsstadium bis zu 200 ml Blut aus der *V. cava cranialis* bzw. *V. jugularis* entnommen und mit dem gleichen Volumen Alsever-Lösung als Antikoagulans (Sigma, Buchs, CH) versetzt.

4.2 Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen

Die Bestimmung der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehaltes, des Hämatokritwertes und der Leukozytenzahl wurde an EDTA-Blut mit einem automatischen Blutkörperchenzählgerät durchgeführt (Celltek, Bayer Diagnostics).

Im Serum wurden insbesondere die Parameter Glukose und Bilirubin mit einem vollselektierten Mehrfachanalysensystem (Hitachi 704, Boehringer) bestimmt. Die Messung der Parameter erfolgte photometrisch. Alle Parameter waren im akuten Anfall signifikant verändert.

4.3 Blutausstriche

Material:

Acridinorange-Stammlösung: 1,5% 3,6-Bis(dimethylamino)-acridin-hydrochlorid Zinkchlorid Doppelsalz (Certistain[®], Merck, Darmstadt, D) in Aqua dest.

Acridinorange-Gebrauchslösung:	Acridinorange-Stammlösung	25	ml
	Aqua dest.	125	ml

Von den EDTA-Blutproben wurden Objektträgerausstriche angefertigt, an der Luft getrocknet, 1 min in 96% Ethanol fixiert und nach erneuter Trocknung 20-60 min in Acridinorange-Gebrauchslösung gefärbt. Nach Spülen mit Aqua dest. wurde der Ausstrich luftgetrocknet und im Fluoreszenzmikroskop bei 600facher Vergrößerung (Ölimmersion) untersucht. Die *M. suis*-Partikel waren als hell- bis dunkelorange rundliche Gebilde von ca. 0,5-0,8 µm Durchmesser auf den Erythrozyten nachweisbar (HEINRITZI, 1990b).

4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Material:

TE-Puffer, pH 8,0:	Tris	(Sigma, Buchs, CH)	10	mM
	EDTA	(Sigma, Buchs, CH)	1	mM
TAE-Puffer, pH 7,6 (50x):	Tris	(Sigma, Buchs, CH)	2	M
	Eisessig	(Merck, Dietikon, CH)	1	M
	EDTA	(Sigma, Buchs, CH)	50	mM

4.4.1 PCR zum Nachweis von *Mycoplasma suis*

Aus 200 µl EDTA-Blut der 14 Schweine aus Gruppe A und B, sowie dem Schwein der Gruppe C (Positivkontrolle) und dem Schwein der Gruppe D (Negativkontrolle) wurde *M. suis*-DNA beziehungsweise Kontroll-DNA extrahiert. Die Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) erfolgte zweimal nach dem Protokoll von SAMBROOK et al. (1989). Die ausgefällte und gereinigte DNA wurde anschliessend in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

Zum Nachweis von *M. suis*-DNA wurde die von HÖLZLE et al. (2000) entwickelte PCR eingesetzt. In jedem PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle (Aqua dest.) und eine Positivkontrolle mit DNA des Plasmids pES 1,8 (enthält das 1,8-kb-*EcoRI*-Fragment von *M. suis*) eingesetzt. Sämtliche Proben wurden zum Nachweis eventuell vorhandener PCR-Inhibitoren bei negativem Ergebnis mit der Positivkontrolle versetzt und erneut amplifiziert.

4.4.2 Analyse von PCR-Produkten durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel unter Zusatz von 0,3 µg/ml Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt, D) durch Elektrophorese aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte über 60 min bei 60 V. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Die Grösse der Amplifikate wurde mit Hilfe des Computerprogramms BioProfil 3.1 (LTF) ermittelt und photographisch (Bildanalyse-System, Fröbel) dokumentiert. Die PCR wurde als positiv bewertet, wenn ein Amplifikat der erwarteten Grösse von 782 bp nachweisbar war.

4.5 Aufreinigung von *Mycoplasma suis*-Antigen aus Blut

Die Reinigung von *M. suis*-Antigen aus dem Blut von Schweinen mit einer hochgradigen *M. suis*-Bakteriämie erfolgte nach dem Verfahren von HALL et al. (1988) in einer Modifikation von HÖLZLE et al. (2000).

Material:

Alsever-Lösung, pH 6,1		(Sigma, Buchs, CH)		
PBS-Lösung, pH 7,4:	NaCl	(Roth, Reinach, CH)	137	mM
	KH ₂ PO ₄	(Sigma, Buchs, CH)	1,5	mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	(Sigma, Buchs, CH)	8,0	mM
	KCl	(Sigma, Buchs, CH)	2,7	mM
Tween 20:	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat	(Merck, Dietikon, CH)		
TE-Puffer, pH 8,0:	Tris	(Sigma, Buchs, CH)	10	mM
	EDTA	(Sigma, Buchs, CH)	1	mM
NaCl-Lösung		(Sigma, Buchs, CH)	1	M

Von den experimentell infizierten Schweinen wurden bei einem akuten Anfall mit hochgradiger charakteristischer Symptomatik und einer mikroskopisch nachgewiesenen hochgradigen *M. suis*-Bakteriämie abhängig vom Körpergewicht bis zu 200 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in 50 ml Polypropylen-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, D) im Verhältnis 1:1 mit Alsever-Lösung aufgenommen und dadurch ungerinnbar gemacht. Das Blut wurde zunächst 20 min mit 275 x g bei RT zentrifugiert (Suprafuge 22, Heraeus). Das Plasma und die Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten (buffy coat) wurden entfernt. Das Erythrozyten-Sediment wurde in einem gleichen Volumen PBS mit 0,15% Tween-20 und 3% EDTA resuspendiert und anschliessend 1 h bei RT geschüttelt (Schüttelgerät, Bühler).

Danach wurde die Erythrozytensuspension 20 min mit 275 x g bei RT zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde 2 h mit 35000 x g bei 4 °C zentrifugiert (Suprafuge 22, Heraeus). Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml TE-Puffer (Resuspension und erneute Zentrifugation) wurde das Pellet in 2 ml NaCl-Lösung resuspendiert, aliquotiert und bei – 20 °C gelagert (*M. suis*-Antigenpräparation).

Aus Blut von nicht infizierten Schweinen der Gruppe B wurde analog eine Kontrollpräparation hergestellt. Der Proteingehalt der *M. suis*- und Kontrollpräparationen wurde mit dem Mikro-Lowry-Verfahren unter Verwendung eines Standards aus bovinem Serumalbumin (BSA) bestimmt (LOWRY et al., 1951).

4.6 Immunisierung eines Kaninchens mit *Mycoplasma suis*

Material:

Xylazin, 2%ig (Rompun[®], Bayer, Leverkusen, D)

Ketamin, 100 mg/ml (Narketan[®] 10, Chassot, Bern, CH)

Emulsigen[®] (MVP Laboratories, INC, Ralston, USA)

Ein weibliches, ca. 2,5 kg schweres Kaninchen der Rasse New Zealand White Outbred (Institut für Versuchstierkunde, Universität Zürich, CH) wurde mit 300 µg der gereinigten *M. suis*-Präparation immunisiert. Die *M. suis*-Präparation wurde zu gleichen Volumenteilen mit dem Adjuvans Emulsigen[®] (MVP Laboratories, Nebraska, USA) gemischt. Diese Präparation, eine Hälfte s.c., die andere i.m. injiziert, entspricht einer Impfdosis. Vor der Immunisierung wurden 1,5 ml Präimmun-Serum durch Blutentnahme aus der Ohrtrandvene gewonnen. Die zweimalige „Boosterung“ wurde mit derselben Impfdosis im Abstand von 21 Tagen nach vorheriger Blutentnahme durchgeführt. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde das Kaninchen unter Narkose (Ketamin 65 mg/kg LM und Xylazin 4 mg/kg LM i.m.) mittels Herzpunktion entblutet. Das Serum wurde durch Zentrifugieren des Blutes gewonnen (10 min, 2000 x g, Labofuge 400, Heraeus).

Für die Untersuchungen im Western Blot wurden das Präimmun-Serum sowie das nach Herzpunktion gewonnene Serum verwendet.

4.7 Reinigung von Kaninchen-anti-*Mycoplasma suis*-IgG durch Protein-A-Affinitätschromatographie

Material:

Protein-A-Säule: 1 ml HiTrap[™] Protein A (Amersham Pharmacia Biotech, Dübendorf, CH)

Auftragspuffer: 20 mM Natriumphosphat, pH 7,0 (Sigma, Buchs, CH)

Elutionspuffer: 100 mM Zitronensäure, pH 2,5 (Roth, Reinach, CH)

Tris-Puffer: 1 M Tris, pH 9,0 (Sigma, Buchs, CH)

Die Reinigung der Immunglobulin G (IgG)-Fraktion erfolgte mit Hilfe des ÄKTA[™]prime-System (Amersham Pharmacia Biotech, Dübendorf, CH). Die Protein-A-Säule wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und mit 10 ml Auftragspuffer äquilibriert. 1 ml des Kaninchenserums wurde in einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule injiziert. Die Säule wurde anschliessend mit 20 ml Auftragspuffer gewaschen. Die IgG-

Fraktion des Serums wurde durch das Auftragen von Elutionspuffer von der Säulenmatrix gelöst. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fractionen in Tris-Puffer aufgefangen. Die Antikörperhaltigen Fractionen wurden durch das Aufzeichnen der UV-Signalkurven und der Leitfähigkeitskurven identifiziert. Der Proteingehalt dieser IgG-Fractionen wurde mittels Mikro-Lowry-Verfahren (LOWRY et al., 1951) bestimmt.

4.8 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Material:

Mini-Protean 3 Elektrophorese-System	(Biorad, Reinach, CH)		
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30%ig, 37,5:1	(Roth, Reinach, CH)		
Trenngel-Puffer:	Tris, pH 8,8	(Sigma, Buchs, CH)	1,88 M
Sammelgel-Puffer:	Tris, pH 6,8	(Sigma, Buchs, CH)	0,5 M
Probenpuffer:	A. bidest.		18,4 ml
	Sammelgel-Puffer		4,0 ml
	Glycerol	(Fluka Chemie, Buchs, CH)	3,2 ml
	SDS, 10%ig	(Sigma, Buchs, CH)	3,2 ml
	Bromphenolblau, 1%ig	(Sigma, Buchs, CH)	1,6 ml
	β-Mercaptoethanol	(Biorad, Reinach, CH)	500 µl
Laufpuffer:	Tris	(Sigma, Buchs, CH)	0,03 M
	Glycin	(Roth, Reinach, CH)	0,23 M
	SDS	(Sigma, Buchs, CH)	0,08 %
Protein-Molekulargewichtsstandard:			
Prestained SDS-PAGE-Standard, broad range	(Biorad, Reinach, CH)		
TEMED	(Biorad, Reinach, CH)		
Ammoniumpersulfat, 10%ig	(Biorad, Reinach, CH)		
Trenngel:	Acrylamid/Bisacrylamidlösung		1,7 ml
	Trenngel-Puffer		1,0 ml
	SDS, 0,5%ig		1,0 ml
	A. bidest.		1,3 ml
	TEMED		10 µl
	Ammoniumpersulfat, 10%ig		40 µl

Die Lösung wurde vorsichtig gemischt, mit einer Glaspipette bis zu einer Höhe von 5 cm zwischen zwei Glasplatten gefüllt und mit Ethanol überschichtet. Nach 1 h war die Polymerisation des Gels abgeschlossen.

Sammelgel:	Acrylamid/Bisacrylamidlösung	0,33	ml
	Sammelgel-Puffer	0,40	ml
	SDS, 0,5%ig	0,40	ml
	A. bidest.	0,87	ml
	TEMED	10	µl
	Ammoniumsulfat, 10%ig	10	µl

Das Ethanol wurde vom Trenngel abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zur Bildung der Probenfächer eingesetzt. Die Polymerisationszeit des Sammelgels betrug 30 min.

Nach Zugabe von Probenpuffer wurden pro Gelfächer 6 µg *M. suis*-Präparation, 6 µg Kontrollpräparation bzw. 1 µg und 0,5 µg IgG-Fraktion auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 40 min. In jedem Lauf wurde der Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

Silberfärbung:

Die Silberfärbung der Gele wurde mit dem Silver Stain Plus Kit (Biorad, Reinach, CH) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.9 Western Blot-Analyse

Material:

Transferrammer:			
Mini Trans-Blot Cell-System	(Biorad, Reinach, CH)		
Protran Nitrocellulose-Transferrmembran			
Porengrösse 0,45 µm	(Schleicher & Schuell, Dassel, D)		
Gel-Blotting-Filterpapier	(Schleicher & Schuell, Dassel, D)		
Western Blot-Puffer:	Tris	(Sigma, Buchs, CH)	25 mM
	Glycin	(Roth, Reinach, CH)	192 mM
	Methanol	(Roth, Reinach, CH)	20 %
TBS:	Tris	(Sigma, Buchs, CH)	10 mM
	NaCl	(Merck, Dietikon, CH)	150 mM
	pH-Wert 8,5		
TBS-Tween:	TBS mit 0,05% Tween 20		
Blocking-Puffer:	TBS		
	2% Magermilchpulver	(Fluka Chemie, Buchs, CH)	
	10% Fetales Kälberserum	(Oxoid, Basel, CH)	
Entwickler-Lösung A:	HRP Color Development Reagent 4CN	(Biorad, Reinach, CH)	60 mg
	Methanol, eiskalt	(Roth, Reinach, CH)	20 ml

Entwickler-Lösung B: TBS, eiskalt		100	ml
H ₂ O ₂ (30%ig)	(Merck, Dietikon, CH)	60	µl

Für die Western Blot-Analyse wurden Filterpapiere und Schwammkissen im Western Blot-Puffer eingeweicht und die Gele sowie die Nitrocellulose-Membran 10 min im Western Blot-Puffer äquiliбриert. Das Blot-Sandwich, bestehend aus Schwammkissen, zwei Blatt Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel, zwei Blatt Filterpapier und Schwammkissen wurde entsprechend den Herstellerangaben in die Transferkammer eingelegt. Die Transferkammer wurde mit Western Blot-Puffer befüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h bei 100 V. Die Transferkammer wurde dabei auf Eis gekühlt. Nach dem Transfer wurde das Methanol durch Waschen in TBS von den Membranen entfernt.

Zur Durchführung der immunologischen Detektion wurden die Membranen 1 h in Blockingpuffer bei RT abgesättigt und anschliessend zweimal 10 min in TBS gewaschen. Die Membranen wurden für 2 h in Serumverdünnungen (Schweineseren: 1:100, Kaninchenseren 1:500 und Protein A-gereinigtes Kaninchen-anti *M. suis*-IgG 1:1000 in Blocking-Puffer) auf dem Schüttler (Platform Shaker STR6, Stuart Scientific) inkubiert. Nach zweimaligen Waschen in TBS (10 min bei RT) wurden die Membranen in verdünntem Konjugat (Peroxidase (POD)-konjugierter Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen bzw. POD-konjugierter Sekundärantikörper Kaninchen anti-Schwein: 1:2000, Sigma, Basel, CH) 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschliessend wurden die Membranen je zweimal für 10 min bei RT in TBS-Tween und TBS gewaschen. Die immunologische Färbung erfolgte in dem Gemisch aus den Entwickler-Lösungen A und B für 20-30 min. Danach wurden die Membranen mehrmals in A. bidest. gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Auswertung der Grösse der detektierten Bande erfolgte mit Hilfe des BioProfil-Bildanalysesystems (Fröbel).

4.10 Überprüfung der Antigen-Reaktivität mit einem POD-konjugierten Kaninchen anti-Schwein Sekundärantikörper

Eine *M. suis*-Präparation, eine Kontrollpräparation und zwei IgG-Fraktionen unterschiedlicher Konzentration (1 µg und 0,5 µg) wurden mittels SDS-PAGE (siehe 4.8) aufgetrennt und ausschließlich mit dem POD-konjugierten Kaninchen anti-Schwein Sekundärantikörper (siehe 4.9) inkubiert.

4.11 Überprüfung der Antigen-Reaktivität mit verschiedenen POD-konjugierten Sekundärantikörpern

Der in 4.10 beschriebene POD-konjugierte Kaninchen anti-Schwein Sekundärantikörper wurde durch die Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen, Ziege anti-Maus, Kaninchen anti-Rind, Esel anti-Schaf und Kaninchen anti-Hund ersetzt.

4.12 Serologische Untersuchung von Schweinen auf Antikörper gegen *Mycoplasma suis* mittels Western Blot-Analyse

Insgesamt wurden 14 Schweine mittels Western Blot-Analyse (siehe 4.9) auf das Vorhandensein von *M. suis*-Antikörpern untersucht. Sieben Schweine wurden im Verlauf der Untersuchung experimentell infiziert und später splenektomiert (Gruppe A). Weitere sieben Schweine wurden nur splenektomiert (Gruppe B). Von jedem Tier wurden jeweils vier Serumproben in definierten Zeitabständen ausgewählt und untersucht.

Gruppe A:

- | | |
|---------------|--|
| 1. Serumprobe | Entnahme am Tag der Aufstallung (Tag 0) |
| 2. Serumprobe | Entnahme unmittelbar vor experimenteller Infektion (Tag 43) |
| 3. Serumprobe | Entnahme 28 Tage nach experimenteller Infektion (Tag 71) |
| 4. Serumprobe | Entnahme durchschnittlich zehn Tage nach akuter Eperythrozoonose (Tag 128) |

Die Splenektomie erfolgte zwischen der Entnahme der 3. und 4. Serumprobe (Tag 107)

Gruppe B:

- | | |
|---------------|---|
| 1. Serumprobe | Entnahme am Tag der Aufstallung (Tag 0) |
| 2. Serumprobe | Entnahme 28 Tage nach Aufstallung (Tag 28) |
| 3. Serumprobe | Entnahme sieben Tage nach Splenektomie (Tag 63) |
| 4. Serumprobe | Entnahme 35 Tage nach Splenektomie (Tag 91) |

Zum Untersuchungszeitpunkt war durch Verschlüsselung eine Zuordnung der Seren zu den Gruppen aufgehoben. Es wurde jeweils eine *M. suis*- und eine Kontrollpräparation mit den präadsorbierten Seren immunologisch detektiert. Ein definiertes Negativ- und Positiv-Kontrollserum sicherten den regelgerechten Ablauf der Untersuchung.

4.13 Untersuchung der Spezifität der Western Blot-Analyse

Um die Spezifität der Western Blot-Analyse zu prüfen, wurden folgende Bakterien getestet: *Leptospira (L.) pomona*, *Pasteurella (P.) multocida*, *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae*, *Salmonella (S.) enterica* ssp. *enterica* Serovar Choleraesuis, *Mycoplasma (M.) agalactiae*, *Chlamydophila (Ch.) abortus*, *Ch. pecorum* und *Chlamydia (C.) suis*. Die Bakterien wurden nach Standardmethoden angezüchtet und Bakteriensuspensionen hergestellt. Der Proteingehalt der Bakterien-Suspensionen wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. Zusätzlich wurde Porcines Parvovirus (PPV) getestet. Das Virus wurde von Frau Privatdozentin Dr. Engels vom Virologischen Instituts der Universität Zürich zur Verfügung gestellt.

Die Bakterien-Suspensionen und das PPV wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse mit den in 4.9 aufgeführten Schweineseren durchgeführt.

4.14 Geräte

Bildanalyse-System	Fröbel, Wasserburg, D
Celltek	Bayer Diagnostics, München, D
Elektrophoresekammern:	
Mini-Sub®Cell GT	Biorad, Reinach, CH
Wide Mini-Sub®Cell GT	Biorad, Reinach, CH
Hitachi 704	Boehringer, Mannheim, D
Platform Shaker STR 6 (Stuart Scientific)	Huber, Reinach, CH
Schüttelgerät	Bühler, Tübingen, D
Spannungsquellen:	
PowerPac 200, 300 und 1000	Biorad, Reinach, CH
Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Rotkreuz, CH
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifugen:	
Rotixa/AP	Hettich, Tuttlingen, D
Labofuge 400	Heraeus, Zürich, CH
Suprafuge 22	Heraeus, Zürich, CH
Megafuge 1.0R	Heraeus, Zürich, CH
Biofuge fresco	Heraeus, Zürich, CH
Biofuge pico	Heraeus, Zürich, CH

4.15 Computerprogramme

Corel-Draw, Version 7.0

Word for Windows 2000

BioProfil 3.1

Corel Corporation, CAN

Microsoft, USA

LTF, Wasserburg, D

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung und allgemeinen Labordiagnostik

Die 14 in die Untersuchungen einbezogenen Schweine waren zum Aufstellungszeitpunkt klinisch gesund. Alle Parameter, die hämatologisch und klinisch-chemisch bestimmt wurden, lagen im Normbereich. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der mit Akridinorange gefärbten Blutaussstriche war in keinem Fall *M. suis* nachweisbar. Der täglich kontrollierte klinische Verlauf und die einmal wöchentlich erfolgten Blutuntersuchungen zeigten keinen Hinweis auf eine zwischenzeitliche Erkrankung der Tiere.

Sechs bis neun Tage nach experimenteller Infektion der sieben Schweine aus Gruppe A kam es zu einem Anstieg der Körpertemperatur von durchschnittlich 39,1 °C auf maximal 40,9 °C. Die Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt unspezifische Krankheitssymptome wie Hautblässe, reduziertes Allgemeinbefinden und verminderte Futteraufnahme. Im Blutaussstrich waren vereinzelt *M. suis* sichtbar. Bei den Blutparametern traten keine signifikanten Veränderungen auf.

Die sieben Tiere aus Gruppe B blieben in diesem Zeitraum klinisch und in den Laboruntersuchungen unauffällig.

Drei bis neun Tage (durchschnittlich 5,4 Tage) nach Splenektomie zeigten alle infizierten Tiere das klinische Bild der akuten Eperythrozoonose. Die Diagnose bestätigte sich bei der Beurteilung im mit Akridinorange gefärbten Blutaussstrich und anhand typischer Veränderungen von Erythrozytenzahl, Hämoglobingehalt, Hämatokritwert, Glukose und Bilirubin. Die Parameter des roten Blutbildes sowie der Glukosespiegel im Serum waren erniedrigt, während der Bilirubingehalt im Serum erhöht war. Im anschliessenden Untersuchungszeitraum trat die gleiche Symptomatik wiederholt im Abstand von 18 bis 40 Tagen (durchschnittlich alle 29,2 Tage) auf. Die klinischen Symptome bildeten sich nach einer dreitägigen Behandlung mit Oxytetracyclin (Terramycin[®], 20-40 mg/kg LM) vollständig zurück.

Die Kontrolltiere zeigten auch nach Splenektomie weiterhin keine Symptome einer *M. suis*-Infektion.

5.2 Nachweis der *Mycoplasma suis*-Infektion mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das PCR-Amplicon der erwarteten Grösse von 782 bp konnte im EDTA-Blut der Schweine aus Gruppe A ab dem siebten Tag nach der experimentellen Infektion, jedoch zu keinem

Zeitpunkt vor der Blutübertragung nachgewiesen werden. Die Blutproben der Tiere aus Gruppe B waren in der PCR stets negativ.

5.3 Herstellung und Charakterisierung des anti-*Mycoplasma suis*-Kaninchen-Hyperimmunserums

Aus dem Blut von *M. suis*-infizierten Schweinen wurden Antigenpräparationen mit einer Proteinkonzentration von 1,4-4,8 mg/ml hergestellt. Die analog hergestellten negativen Kontrollpräparationen enthielten 0,3–0,6 mg Protein/ml. Alle Antigenpräparationen wurden in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Dabei traten bei den *M. suis*-Präparationen und den Kontrollpräparationen unterschiedliche Proteinmuster auf.

Ein Kaninchen wurde mit einer gereinigten *M. suis*-Präparation immunisiert. Nach zweimaliger Boosterung wurde das polyklonale Kaninchen-Hyperimmunserum gewonnen.

Dieses anti-*M. suis*-Kaninchen-Hyperimmunserum wurde auf seine Reaktivität mit immunogenen Strukturen von *M. suis* überprüft. Hierfür wurden fünf *M. suis*-Präparationen (Gruppe A) und zwei Kontrollpräparationen (Gruppe B) mit dem anti-*M. suis*-Kaninchen-Hyperimmunserum im Western Blot untersucht. Bei den fünf *M. suis*-Präparationen konnten zwei immunreaktive Banden mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und 77 kDa detektiert werden. Bei allen *M. suis*-Präparationen sowie bei den Kontrollpräparationen war zusätzlich eine Bande mit einem Molekulargewicht von 56 kDa vorhanden. Bei der Untersuchung des Präimmun-Serums wurden keine Banden detektiert (Abbildung 1).

5.4 Etablierung einer Western Blot-Analyse zum Nachweis von *Mycoplasma suis*-spezifischen Antikörpern in Schweineseren

Für den Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *M. suis*-Partialantigene in infizierten Schweinen wurden *M. suis*-Präparationen und Kontrollpräparationen mit definierten Schweineseren im Western Blot analysiert. Das positive Schweineserum detektierte drei Banden mit einem Molekulargewicht von 45, 56 und 77 kDa in den *M. suis*-Präparationen (Abbildung 2).

Das negative Schweineserum und der POD-konjugierte Kaninchen anti-Schwein Sekundärantikörper reagierten in den *M. suis*-Präparationen ebenfalls mit einer 56 kDa grossen Bande. Die 45 kDa und 77 kDa grossen Banden wurden durch das negative Schweineserum und den Sekundärantikörper nicht detektiert (Abbildung 2).

In den Kontrollpräparationen wurden durchgängig keine Banden nachgewiesen.

5.5 Reaktivität von *Mycoplasma suis*-Antigen mit verschiedenen POD-konjugierten Sekundärantikörpern

Zur Abklärung des Ursprungs der 56 kDa grossen Proteinbande wurde die Reaktivität des POD-konjugierten Kaninchen anti-Schwein Sekundärantikörpers mit der *M. suis*-Präparation, der Kontrollpräparation und einer kommerziell erhältlichen Schweine-IgG-Fraktion vergleichend untersucht.

Der Kaninchen anti-Schwein Sekundärantikörper reagierte in der *M. suis*-Präparation und in der IgG-Fraktion mit der 56 kDa grossen Bande. In der Kontrollpräparation wurde die 56 kDa grosse Proteinbande nicht detektiert (Abbildung 3).

Ausserdem wurden die *M. suis*- und Kontrollpräparation sowie die IgG-Fraktion hinsichtlich ihrer Reaktivität mit den POD-konjugierten Sekundärantikörpern Ziege anti-Kaninchen, Ziege anti-Maus, Kaninchen anti-Rind, Esel anti-Schaf und Kaninchen anti-Hund untersucht. In keinem Fall zeigte sich bei den IgG-Fractionen, der *M. suis*- und der Kontrollpräparation eine Bande (Abbildung 3).

5.6 Serologische Untersuchung von Schweinen auf Antikörper gegen *Mycoplasma suis* mittels Western Blot-Analyse

Bei der Untersuchung der jeweils 28 Serumproben der Gruppen A und B im Western Blot zeigten sich folgende Ergebnisse: Die Untersuchung der Serumproben 1 und 2 ergab bei allen Tieren der Gruppe A folgendes Bandenmuster: 56 kDa positiv, 45 kDa und 77 kDa negativ. Im Gegensatz dazu konnten mit den Serumproben 3 und 4 bei sechs von sieben Tieren alle drei Banden (45 kDa, 56 kDa, 77 kDa) detektiert werden (Abbildung 4). In der Untersuchung der Probe 3 von Schwein 05/99 war ausschliesslich die 56 kDa-Bande sichtbar (Tabelle 1A, 1B).

Bei der Untersuchung der Serumproben von Gruppe B wurde ebenfalls die Bande mit einem Molekulargewicht von 56 kDa detektiert (Tabelle 2, Abbildung 5).

Um die Reproduzierbarkeit der Western Blot-Ergebnisse zu überprüfen, wurde aus jeder Gruppe eine Serumprobe willkürlich ausgewählt. Beide Seren wurden in drei aufeinander folgenden Western Blot-Analysen untersucht. Hierbei bestätigte sich jeweils das erste Ergebnis.

5.7 Spezifität der Western Blot-Analyse

Zur Prüfung der Spezifität wurde der Western Blot mit den Antigenpräparationen von anderen für das Schwein relevanten Erregern durchgeführt. Verwendet wurden Präparationen von *L. pomona*, *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae*, *S. enterica* ssp. *enterica* Serovar Choleraesuis, *M. agalactiae*, *Ch. abortus*, *Ch. pecorum*, *C. suis* und porcines Parvovirus (PPV).

Zur immunologischen Detektion wurde das definierte negative und positive Kontrollserum verwendet. Bei *P. multocida*, *S. enterica* ssp. *enterica* Serovar Choleraesuis und *A. pleuropneumoniae* zeigten sich Banden verschiedener Grösse, jedoch nicht das für *M. suis*-Präparationen typische Bandenmuster. Alle anderen Präparationen reagierten nicht mit den verwendeten Schweineseren.

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Western Blot-Analyse zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycoplasma (M.) suis* beim Schwein.

Die Diagnose der porcinen Eperythrozoonose erfolgt bisher durch den biologischen Nachweis mittels Splenektomie (HEINRITZI, 1984b). Der hierdurch provozierte akute Anfall ist pathognomonisch und gekennzeichnet durch Fieber bis 42°C, Blässe, Ikterus, zyanotische Veränderungen an den Akren, Anämie, Erythrozytopenie, Abfall der Glucosekonzentration sowie Anstieg des Bilirubingehaltes im Serum. In diesem Krankheitsstadium lässt sich der Erreger mikroskopisch im Blutaussstrich nachweisen (SCHULLER et al., 1990). Nicht geeignet ist die oben beschriebene Methode für die Routinediagnostik, weil sie zeit- und kostenintensiv ist und nur die Detektion von Einzeltieren gewährleistet (ADELT, 1999). Weiterhin sind Fehlinterpretationen beim mikroskopischen Erregernachweis durch mitangefärbte unreife Erythrozyten und Howell-Jolly Körperchen nicht auszuschließen (HENRY, 1979; HEINRITZI, 1990a; HÖLZLE et al., 2003).

Die von HÖLZLE et al. (2000, 2003) entwickelte PCR zum Nachweis von *M. suis* aus Schweineblut ermöglicht mit hoher Sicherheit die Identifizierung von klinisch gesunden, *M. suis*-infizierten Trägartieren. Für den Einsatz der PCR in der routinemäßigen Bestandsdiagnostik muss eine strikte räumliche und zeitliche Trennung der einzelnen PCR-Stationen, sowie ein konsequentes Qualitätsmanagement zur Vermeidung eines sogenannten „product carryover“ gewährleistet sein (HÖLZLE et al., 2000).

Serologische Screening-Verfahren dagegen sind relativ schnell durchführbar, erlauben die Untersuchung großer Probenzahlen mit wenig Aufwand, sind wenig störanfällig, kostengünstig und deshalb für die Bestandsdiagnostik geeignet.

M. suis, der Erreger der Eperythrozoonose beim Schwein, ist in vitro nicht kultivierbar und über die mikrobiellen sowie immunologischen Eigenschaften des Erregers ist deshalb bisher wenig bekannt. Für die Analyse möglicher immunogener Strukturen des Erregers wurde ein Hyperimmunserum im Kaninchen hergestellt. Hierzu wurde nach der Methode von HALL et al. (1988), modifiziert von HÖLZLE et al. (2000) *M. suis*-Antigen aus dem Blut von experimentell infizierten Schweinen im akuten Anfall aufgereinigt. Die auf diese Weise gewonnenen *M. suis*-Präparationen sind frei von Erythrozyten, Erythrozytenmembranen, Leukozyten, Thrombozyten und den meisten Blutproteinen (HALL et al., 1988). Mittels der von HÖLZLE et al. (2000, 2003) beschriebenen PCR konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den Antigenpräparationen um *M. suis* handelte. Diese Präparationen wurden für die Immunisierung des Kaninchens verwendet.

In der Western Blot-Analyse mit dem anti-*M. suis*-Kaninchen-Hyperimmunserum wurden in fünf verschiedenen *M. suis*-Präparationen jeweils zwei Banden mit einem Molekulargewicht

von 45 kDa und 77 kDa detektiert. Zusätzlich wurde bei diesen Präparationen eine Bande mit einem Molekulargewicht von 56 kDa gefunden. Kontrollpräparationen aus dem Blut von nicht infizierten Schweinen zeigten nach der Inkubation mit dem anti-*M. suis*-Kaninchen-Hyperimmunserum lediglich die Bande mit einem Molekulargewicht von 56 kDa. Aufgrund dieses Ergebnisses war zu vermuten, dass es sich bei den 45 kDa und 77 kDa grossen Banden um *M. suis*-spezifische immunogene Proteine handelt, welche eine *M. suis*-spezifische Immunantwort induzieren.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die beiden Proteinbanden (45 kDa, 77 kDa) auch in *M. suis*-infizierten Schweinen immunologisch beantwortet werden. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden in der Western Blot-Analyse *M. suis*- und entsprechende Kontrollpräparationen sowohl mit definiertem positivem als auch mit definiertem negativem Schweineserum im Western Blot inkubiert. Beide immunogenen Proteine wurden in den *M. suis*-Präparationen mit dem positiven und nicht mit dem negativen Serum detektiert. Eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von 56 kDa trat bei den *M. suis*-Präparationen auf. Auffallend war allerdings, dass diese Bande auch bei der Inkubation mit dem negativen Schweineserum detektiert wurde. Da diese Proteinbande aber auch mit dem Sekundärantikörper allein reagierte, lag die Vermutung nahe, dass es sich dabei um ein porcines Immunglobulin handelt. Dieser Sachverhalt konnte durch vergleichende Analyse der *M. suis*-Präparation mit kommerziellem, aufgereinigtem porcinen Immunglobulin abgeklärt werden. Diese Immunglobuline werden also bei der Isolierung von *M. suis* aus dem Schweineblut mitaufgereinigt. Da diese Immunglobuline in den Kontrollpräparationen nicht zu finden waren, ist es wahrscheinlich, dass ihre Bildung durch die *M. suis*-Infektion im Schwein induziert wird. Es könnte sich also dabei um die bei *M. suis*-Infektionen beschriebenen Kälteagglutinine handeln (HOFFMANN et al., 1981). Aufgrund dieser Überlegungen wurde das Auftreten der 56 kDa-Bande als unspezifische Immunreaktion und somit Serumproben, die nur diese Bande detektierten als negativ gewertet. Serumproben, bei denen die 45 kDa und 77 kDa Banden auftraten, galten als positiv. Für die Validität eines serologischen Testverfahrens ist allerdings die Reinheit des verwendeten Testantigens von entscheidender Bedeutung. Dies ist unter den beschriebenen Bedingungen vor allem für Testsysteme wichtig, die nicht zwischen der Reaktion des Primär- und des Sekundärantikörpers unterscheiden können (z.B. ELISA).

Die weitere Evaluierung der Western Blot-Analyse wurde mit ausgewählten Schweineseren von sieben experimentell infizierten und später splenektomierten (Gruppe A) sowie sieben nicht infizierten, splenektomierten Tieren (Gruppe B) durchgeführt. Alle Seren der Gruppe A, die am Tag 0 und am Tag 43 unmittelbar vor experimenteller Infektion entnommen wurden, reagierten negativ. Sechs von sieben Seren (86 %), die 28 Tage nach experimenteller Infektion (Tag 71) gewonnen wurden, zeigten ein positives Ergebnis. Alle sieben Seren, die

durchschnittlich zehn Tage nach akuter Eperythrozoonose (Tag 128) entnommen wurden, waren in der Western Blot-Analyse positiv. Die Serumproben der Gruppe B waren alle negativ. Somit liess sich bei sechs von sieben Tieren eine Infektion bereits im latenten Stadium vor Splenektomie nachweisen. Eine Erklärungsmöglichkeit für das falsch-negative Ergebnis bei der Detektion der *M. suis*-Partialantigene mit dem Serum des Schweines 05/99 28 Tage p.i. könnte sein, dass keine ausreichende Erregervermehrung im Tier und somit keine nachweisbare Immunantwort stattgefunden hat.

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels Western Blot-Analyse experimentell infizierte, klinisch gesunde Trägartiere in 86 % erkannt werden. Bislang standen zum serologischen Nachweis von *M. suis*-Infektionen KBR, IHA und ELISA zur Verfügung, wobei keines dieser Nachweisverfahren chronisch infizierte Trägartiere erkennt. Die Erkennung von latent infizierten Tieren in Schweinebeständen ist jedoch Voraussetzung für eine effektive Bekämpfung der Eperythrozoonose.

SPLITTER (1958) konnte in der KBR einen positiven Titer ab dem ersten bis siebten Tag nach einer akuten Eperythrozoonose feststellen, der über 14–21 Tage persistierte. Latent infizierte Trägartiere waren in der KBR negativ. Die IHA wurde als Verbesserung zur KBR angesehen (SMITH und RAHN, 1975) und zeigte eine höhere Empfindlichkeit (BALJER et al., 1989). Bei der von SMITH und RAHN (1975) durchgeführten Studie wurden allerdings nur splenektomierte Schweine untersucht. Ein Anstieg der IgM-Kälteagglutinine im Serum infizierter Tiere war bereits vor Ausbruch der Erkrankung zu erkennen. Jedoch wurde für eine deutliche Ak-Reaktion bei nicht splenektomierten Tieren zumindest eine leichte klinische Erkrankung vorausgesetzt (BALJER et al., 1989). Der IgM-Ak-Nachweis in der IHA war nur zeitlich befristet um die Erkrankung möglich, so dass die Gefahr falsch-negativer Testergebnisse vorhanden war (HEINRITZI, 1990a). Der ELISA erbrachte wiederum eine Verbesserung der Sensitivität im Vergleich zur IHA (HSU et al., 1992). Dies wurde einerseits dadurch erklärt, dass geringere Konzentrationen der Antikörper detektiert werden konnten, andererseits dadurch, dass leichte Ketten aller Immunglobulinklassen und nicht nur IgM-Antikörper nachgewiesen wurden. Im ELISA kam es frühestens 14 Tage p.i. zu einem Titeranstieg, diese blieben bis zum Versuchsende (56.-60. Tag) positiv. Es zeigten sich sehr unterschiedliche Titerhöhen bei splenektomierten und nicht splenektomierten Tieren (SCHULLER et al., 1990). Damit ergab sich eine Abhängigkeit von der Erregermenge, die in splenektomierten Tieren wesentlich höher ist. Um falsch-positive Ergebnisse durch Kälteagglutinin-Ak im ELISA auszuschließen, müssen die Seren mit Erythrozyten von gesunden Schweinen präadsorbiert werden. Eine effizientere Aufreinigung der Antigen-Präparationen ist erforderlich (SCHULLER et al., 1990).

Die Vorteile der Western Blot-Analyse liegen darin, dass durch die Auftrennung des heterogenen Proteingemisches in der SDS-PAGE der Nachweis von *M. suis*-spezifischen

Partialantigenen erfolgt. Die Western Blot-Analyse ist im Gegensatz zum ELISA ein qualitativer Test, d.h. ab einer bestimmten Nachweisgrenze ist er unabhängig von der Erregerzahl und der daraus resultierenden Ak-Bildung. Der Vorteil gegenüber der KBR, der IHA und dem ELISA liegt jedoch vor allem darin, dass spezifisch gegen *M. suis*-Partialantigene gerichtete Antikörper und keine Kälteagglutinine gemessen werden. Bei der Anwendung des ELISA können unspezifische, falsch-positive Reaktionen nicht ausgeschlossen werden.

Um die Einsatzfähigkeit des entwickelten Verfahrens zur Detektion von *M. suis*-infizierten Trägartieren in Schweinebeständen besser beurteilen zu können, sind weitere Untersuchungen des vorhandenen Serumkollektivs notwendig. In einer fortführenden Studie sollte erarbeitet werden, ab welchem Zeitpunkt p.i. die spezifisch gegen *M. suis*-Partialantigene gerichteten Antikörper nachweisbar sind und über welchen Zeitraum diese persistieren.

Die vorgelegte Arbeit stellt einen Beitrag zur Antigenanalyse des bisher nicht kultivierbaren Erregers dar. Die beschriebene Methode der Aufreinigung von *M. suis*-Partikeln aus Blut und die anschließende Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse dienen als Grundlage für weiterführende immunologische Studien. Generell könnte eine wesentliche Verbesserung der Serodiagnostik durch die Herstellung eines standardisierten Antigens, z.B. über rekombinante Proteine, erzielt werden.

7 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1A: Ergebnisse der serologischen Untersuchung in der Western Blot-Analyse, Gruppe A

Gruppe A 01/99, 02/99, 03/99, 04/99, 06/99, 07/99	56 kDa-Bande	45 kDa-Bande	77 kDa-Bande
Serumprobe 1 Entnahme am Tag der Aufstallung (Tag 0)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 2 Entnahme unmittelbar vor experimenteller Infektion (Tag 43)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 3 Entnahme 28 Tage nach experimenteller Infektion (Tag 71)	positiv	positiv	positiv
Serumprobe 4 Entnahme durchschnittlich zehn Tage nach akuter Eperythrozoonose (Tag 128)	positiv	positiv	positiv

Tabelle 1B: Ergebnisse der serologischen Untersuchung in der Western Blot-Analyse, Gruppe A, Schwein 05/99

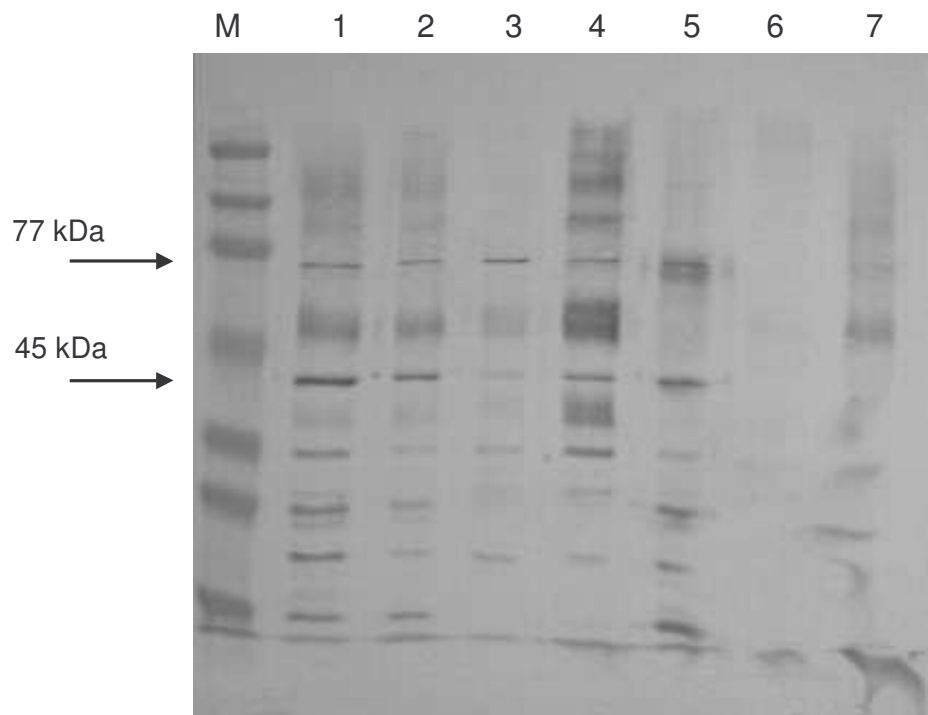
Gruppe A 05/99	56 kDa-Bande	45 kDa-Bande	77 kDa-Bande
Serumprobe 1 Entnahme am Tag der Aufstallung (Tag 0)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 2 Entnahme unmittelbar vor experimenteller Infektion (Tag 43)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 3 Entnahme 28 Tage nach experimenteller Infektion (Tag 71)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 4 Entnahme durchschnittlich zehn Tage nach akuter Eperythrozoonose (Tag 128)	positiv	positiv	positiv

Die Splenektomie erfolgte zwischen der Entnahme der 3. und 4. Serumprobe (Tag 107)

Tabelle 2: Ergebnisse der serologischen Untersuchung in der Western Blot-Analyse, Gruppe B

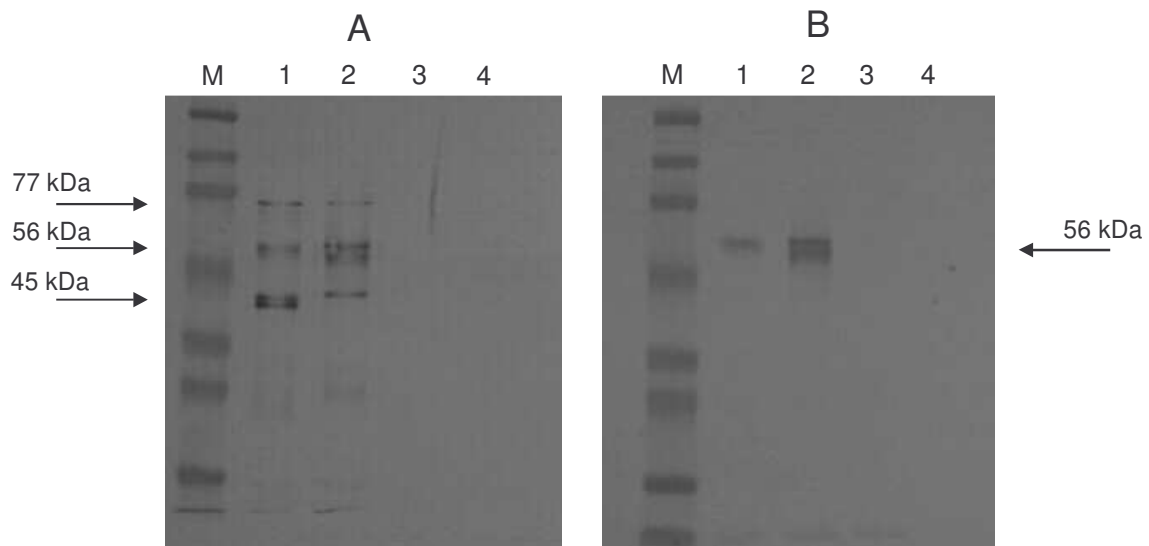
Gruppe B 11/99, 12/99, 13/99, 14/99, 15/99, 16/99, 17/99	56 kDa-Bande	45 kDa-Bande	77 kDa-Bande
Serumprobe 1 Entnahme am Tag der Aufstallung (Tag 0)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 2 Entnahme 28 Tage nach Aufstallung (Tag 28)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 3 Entnahme sieben Tage nach Splenektomie (Tag 63)	positiv	negativ	negativ
Serumprobe 4 Entnahme 35 Tage nach Splenektomie (Tag 91)	positiv	negativ	negativ

Abbildung 1: Western Blot-Analyse von *Mycoplasma suis* mit einem anti-*M. suis*-Kaninchen-Hyperimmunserum



- Spur M: Molekulargewichtsstandard, 5 µg
- Spur 1: *M. suis*-Präparation 1, 6 µg
- Spur 2: *M. suis*-Präparation 2, 6 µg
- Spur 3: *M. suis*-Präparation 3, 6 µg
- Spur 4: *M. suis*-Präparation 4, 6 µg
- Spur 5: *M. suis*-Präparation 5, 6 µg
- Spur 6: Kontrollpräparation 1, 6 µg
- Spur 7: Kontrollpräparation 2, 6 µg

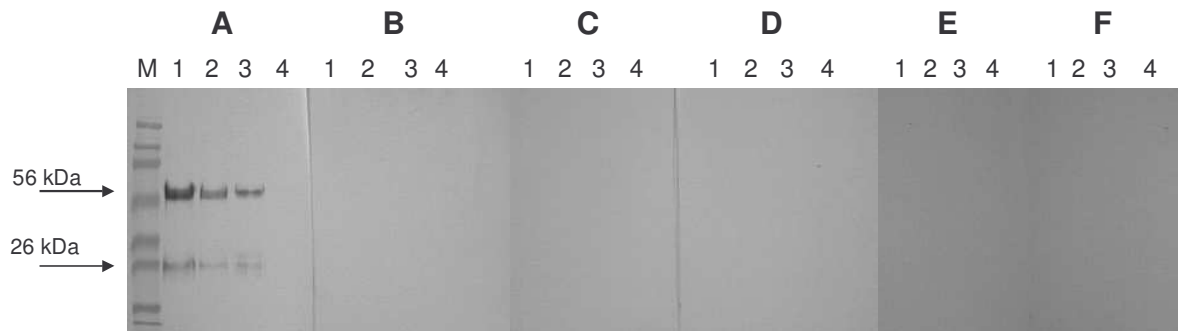
Abbildung 2: Western Blot-Analyse von *Mycoplasma suis*



- Spur M: Molekulargewichtsstandard, 5 µg
- Spur 1: *M. suis*-Präparation 1, 3 µg
- Spur 2: *M. suis*-Präparation 2, 3 µg
- Spur 3: Kontrollpräparation 1, 3 µg
- Spur 4: Kontrollpräparation 2, 3 µg

Immunologische Detektion mit Serum von einem Schwein vor (A) und nach (B) einer *M. suis*-Infektion

Abbildung 3: Western Blot-Analysen mit verschiedenen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern

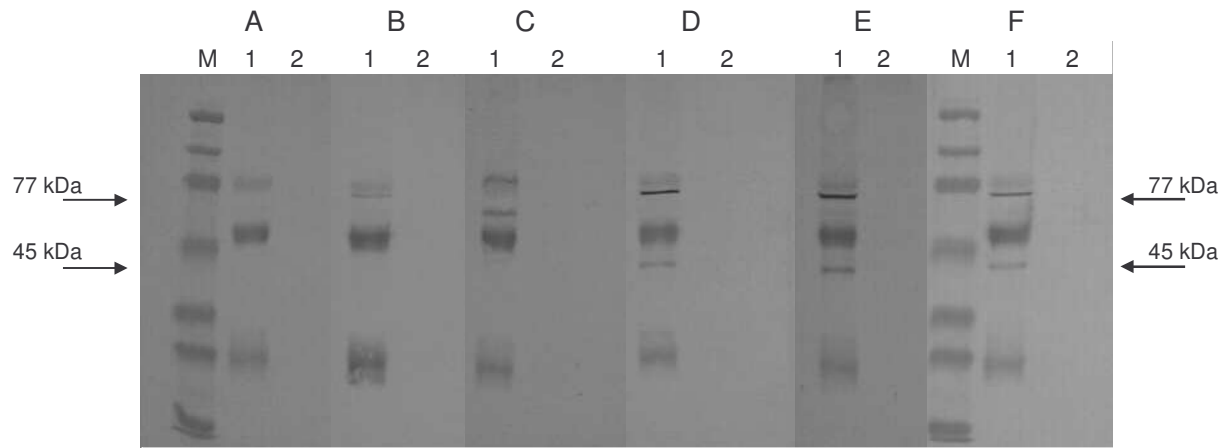


Spur M: Molekulargewichtsstandard, 5 μ g
 Spur 1: *M. suis*-Präparation, 6 μ g
 Spur 2: Porcines IgG, 1 μ g
 Spur 3: Porcines IgG, 0,5 μ g
 Spur 4: Kontrollpräparation, 6 μ g

Immunologische Detektion mit POD-konjugiertem Sekundärantikörper

A: Kaninchen anti-Schwein
 B: Kaninchen anti-Rind
 C: Kaninchen anti-Hund
 D: Esel anti-Schaf
 E: Ziege anti-Kaninchen
 F: Ziege anti-Maus

Abbildung 4: Western Blot-Analysen am Schwein 04/99, Gruppe A, vor und nach experimenteller *Mycoplasma suis*-Infektion

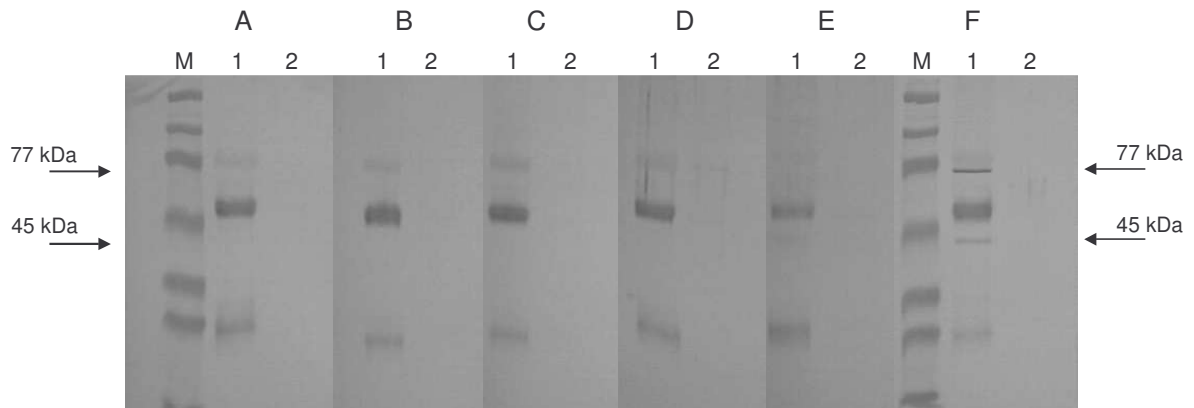


Spur M: Molekulargewichtsstandard, 5 µg
 Spur 1: *M. suis*-Präparation, 6 µg
 Spur 2: Kontrollpräparation, 6 µg

Immunologische Detektion mit

- A: Negatives Kontrollserum
- B: Serumprobe 1 (Tag 0, Entnahme am Tag der Aufstallung)
- C: Serumprobe 2 (Tag 43, Entnahme unmittelbar vor experimenteller Infektion)
- D: Serumprobe 3 (Tag 71, Entnahme 28 Tage nach experimenteller Infektion)
- E: Serumprobe 4 (Tag 128, Entnahme durchschnittlich zehn Tage nach akuter Eperythrozoonose)
- F: Positives Kontrollserum

Abbildung 5: Western Blot-Analysen am Schwein 17/99, Gruppe B, nicht infizierte Kontrollschweine



Spur M: Molekulargewichtsstandard, 5 μ g

Spur 1: *M. suis*-Präparation, 6 μ g

Spur 2: Kontrollpräparation, 6 μ g

Immunologische Detektion mit

A: Negatives Kontrollserum

B: Serumprobe 1 (Tag 0, Entnahme am Tag der Aufstallung)

C: Serumprobe 2 (Tag 28, Entnahme 28 Tage nach Aufstallung)

D: Serumprobe 3 (Tag 63, Entnahme sieben Tage nach Splenektomie)

E: Serumprobe 4 (Tag 91, Entnahme 35 Tage nach Splenektomie)

F: Positives Kontrollserum

8 Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Actinobacillus</i>
A. (bi)dest.	Aqua (bi)destillata
Ag	Antigen
AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
Ak	Antikörper
BGM	Buffalo Green Monkey
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C.	<i>Chlamydia</i>
ca.	circa
Ch.	<i>Chlamydophila</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Eperythrozoon</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
fg	Femtogramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
H.	<i>Hämobartonella</i>
h	Stunde
IAC	Isoamylalkohol/Chloroform (1:24)
Ig	Immunglobulin
IHA	Indirekte Hämagglutination
i.m.	intramuskulär
kb	Kilobasen
KBR	Komplementbindungsreaktion
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L.	<i>Leptospira</i>
LM	Lebendmasse
M	Molar, Mol pro Liter
M.	<i>Mycoplasma</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
<i>P.</i>	<i>Pasteurella</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pg	Pikogramm
p.i.	post infectionem
POD	Peroxidase
PPV	Porcines Parvovirus
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
s.c.	subkutan
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
<i>V.</i>	<i>Vena</i>
V	Volt

9 Literaturverzeichnis

ADELT D. (1999)

Etablierung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *Eperythrozoon suis*
Vet. Med. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität München

BALJER G., HEINRITZI K., WIELER L. (1989)

Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination zum *Eperythrozoon suis*-Nachweis in
experimentell und spontan infizierten Schweinen

J. Vet. Med. B **36**, 417-423

BOLLWAHN W. (1982)

Die Eperythrozoonose (Ikteroanämie) der Schweine

Prakt. Tierarzt **63**, 1043-1045

BROWN J. C., COLLING R. G. (1982)

Properties of cold agglutinin and group carbohydrate-specific antibodies isolated from group
C streptococcal antisera

Mol. Immunol. **19**, 457-465

BROWNBACK A. (1981)

Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine

Vet. Med. **76**, 375-378

COLLING R. G., PEARSON T. C., BROWN J. C. (1983)

Association of Bacterial Carbohydrate-Specific Cold Agglutinin Antibody Production with
Immunization by Group C, Group B Type III, and *Streptococcus pneumoniae* Type XIV
Streptococcal Vaccines

Infect. Immun. **41**, 205-213

GRESHAM A. C. J., ROGERS J. P. (1994)

Eperythrozoon suis in weaned pigs

Vet. Rec. **134**, 71-72

GWALTNEY S.M., HAYS M.P., OBERST R.D. (1993)

Detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction

J. Vet. Diagn. Invest. **5**, 40-46

GWALTNEY S.M., OBERST R.D. (1994)

Comparison of an improved polymerase chain reaction protocol and the hemagglutination assay in the detection of *Eperythrozoon suis* infection

J. Vet. Diagn. Invest. **6**, 321-325

HALL S.M., CIPRIANO J.A., SCHONEWEIS D.A., SMITH J.E., FENWICK B.W. (1988)

Isolation of infective and non-infective *Eperythrozoon suis* bodies from the whole blood of infected swine

Vet. Rec. **123**, 651

HEINRITZI K. (1984a)

Klinik, Hämatologie und Metabolismus des eperythrozoonotischen Anfalls

Prakt. Tierarzt **65** „Collegium Veterinerium XIV“, 40-44

HEINRITZI K. (1984b)

Ein Beitrag zur Splenektomie beim Schwein

Tierärztl. Prax. **12**, 219-230

HEINRITZI K. (1989)

Eperythrozoon-Infektion beim Schwein als Faktorenkrankheit

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **102**, 337-342

HEINRITZI K. (1990a)

Zur Diagnostik der Eperythrozoon-suis-Infektion

Tierärztl. Prax. **18**, 477-481

HEINRITZI K. (1990b)

Untersuchungen zur Pathogenese und Diagnostik der Infektion mit *Eperythrozoon suis*

Habilitationsschrift, München

HEINRITZI K., WENTZ I., BOLLWAHN W. (1984)

Hämatologische Befunde bei der akuten Eperythrozoonose der Schweine

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **97**, 404-407

HEINRITZI K., PLANK G., PETERANDERL W., SANDNER N. (1990)

Untersuchungen zum Säure-Basen-Haushalt und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Infektion mit *Eperythrozoon suis*

J. Vet. Med. B **37**, 412-417

HENRY S.C. (1979)

Clinical Observations on Eperythrozoonosis

J. Am. Vet. Med. Ass. **174**, 601-603

HÖLZLE L.E., ADELDT D., HEINRITZI K., WITTENBRINK M.M. (2000)

Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *Eperythrozoon suis* beim Schwein

Tierärztl. Prax. **28**, 47-50

HÖLZLE L.E., ADELDT D., HÖLZLE K., HEINRITZI K., WITTENBRINK M.M. (2003)

Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood

Veterinary Microbiology **93**, 185-196

HOFFMANN, R., SCHMID, D.O., HOFFMANN-FETZER, G. (1981)

Erythrocyte antibodies in porcine eperythrozoonosis

Vet. Immunol. Immunopathol. **2**, 111-119

HSU F.S., LIU M.C., CHOU S.M., ZACHARY J.F., SMITH A.R. (1992)

Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Eperythrozoon suis* antibodies in swine

Am. J. Vet. Res. **53**, 352-354

KINGSLEY K., HIBBS C. M. (1968)

Eperythrozoonosis in Swine: A Review

Vet. Med. Small Anim. Clin. **63**, 971-972

KLOSTER A. M., DESCARGA C. O., DAVIES P., PISCITELLI H. G., DIAZ L. R., ZIELINSKI G. C. (1987)

Eperythrozoonosis porcina: Observaciones sobre la infeccion natural y experimental

Vet. Arg. **31**, 27-40

KREIER J. P., GOTHE R. (1976)

Aegyptianellosis, Eperythrozoonosis, Grahamellosis and Haemobartonellosis
Vet. Parasitol. **2**, 83-95

LOWRY O.N., ROSEBROUGH N.J., FARR L., RANDALL R.J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. **193**, 265-278

LIEBICH H. G., HEINRITZI K. (1992)

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Eperythrozoon suis
Tierärztl. Prax. **20**, 270-274

MESSICK J. B., COOPER S.K., HUNTLEY M. (1999)

Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16S rRNA gene
for detection of *Eperythrozoon suis* infection
J. Vet. Diagn. Invest. **11**, 229-236

MESSICK J. B., WALKER P. G., RAPHAEL W., BERENT L., SHI X. (2002)

‘*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*’ sp. nov., ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 693-698

MÜLLER E., NEDDENRIEP G. (1979)

Eperythrozoonose in einem Ferkelerzeugerbetrieb in Norddeutschland
Prakt. Tierarzt **8**, 662-665

NEIMARK H., JOHANSSON K.-E., RIKIHISA Y., TULLY J. G. (2001)

Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mykoplasma wenyonii*’
Int. J. Syst. Evol. Microbiol **51**, 891-899

OBERST R. D., HALL S. M., SCHONEWEIS D. A. (1990a)

Detection of *Eperythrozoon suis* DNA from swine blood by whole organism DNA hybridizations

Vet. Microbiol. **24**, 127-134

OBERST R. D., HALL S. M., JASSO R. A., ARNDT T., WEN L. (1990b)

Recombinant DNA probe detecting *Eperythrozoon suis* in swine blood

Am. J. Vet. Res. **51**, 1760-1764

PETERANDERL W. (1988)

Untersuchungen über den Glucose-, Lactat- und Pyruvatgehalt sowie den Säure-Basenhaushalt im venösen Blut bei der Eperythrozoonose des Schweines

Vet. Med. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität München

POSPISCHIL A., HOFFMANN R. (1982)

Eperythrozoon suis in Naturally Infected Pigs: A Light and Electron Microscopic Study

Vet. Pathol. **19**, 651-657

QUINN A. H. (1938)

A herd condition of swine characterized by icterus and anemia

J. am. Vet. Med. Ass. **93**, 327-328

RIKIHISA Y., KAWAHARA M., WEN B., KOCIBA G., FUERST P., KAWAMORI F., SUTO CH., SHIBATA S., FUTOHASHI M. (1997)

Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and Comparison of 16S rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis* and *Eperythrozoon suis*

J. Clin. Microbiol. **35**, 823-829

ROBB A. D. (1943)

Ictero-Anemia in Growing Swine

Vet. Med. **38**, 271-274

ROSENKRANS C. J., ZINN G. M., JESSE G. W. (1984)

Chlortetracycline as a treatment against the effects of eperythrozoonosis on sow productivity

Proc.: 8. Congress International Pig Veterinary Society, Ghent, 210

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989)

Molecular cloning (2nd ed.)

Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA

SCHMIDT P., KASPERS B., JÜNGLING A., HEINRITZI K., LÖSCH U. (1992)

Isolation of cold agglutinins in *Eperythrozoon suis*-infected pigs

Vet. Immunol. Immunopathol. **31**, 195-201

SCHULLER W., HEINRITZI K., AL-NUKTHA S., KÖLBL S., SCHUH M. (1990)

Serologische Verlaufsuntersuchungen mittels KBR und ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die Eperythrozoon-suis-Infektion des Schweines

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **103**, 9-12

SMITH A.R. (1992)

Eperythrozoonosis

In: Leman A. D., Straw B. E., Glock R. D., Mengeling W. L., D'Allaire S., Taylor D. J. (Hrsg.)

Disease of Swine, 7. Auflage, 470-474

Iowa State University Press, Ames Iowa

SMITH J. E., CIPRIANO J. E., HALL S. M. (1990)

In vitro und *in vivo* glucose consumption in swine eperythrozoonosis

J. Vet. Med. B **37**, 587-592

SMITH A. R., RAHN T. (1975)

An Indirect Hemagglutination Test for the Diagnosis of *Eperythrozoon suis* Infection in Swine

Am. J. Vet. Res. **36**, 1319-1321

SPLITTER E. J. (1958)

The Complement-Fixation Test in Diagnosis of Eperythrozoonosis in Swine

J. Am. Vet. Med. Ass. **132**, 47-49

ZACHARY J. F., BASGALL E. J. (1985)

Erythrocyte Membrane Alterations Associated with the Attachment and Replication of *Eperythrozoon suis*: A Light and Electron Microscopic Study

Vet. Pathol. **22**, 164-170

ZACHARY J. F., SMITH A. R. (1985)

Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses

Am. J. Vet. Res. **46**, 821-830

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. M. Wittenbrink für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung sowie die gewährte fachliche und finanzielle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Heinritzi für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die wertvolle und freundliche Beratung, die gewährte fachliche und finanzielle Unterstützung bei den praktischen Arbeiten und der Bereitstellung der Schweine und Probenmaterialien. Für die Übernahme des Korreferats danke ich ebenfalls.

Ganz herzlichen Dank auch an Herrn Dr. Ludwig Hölzle sowie Frau Dr. Katharina Hölzle für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung während den molekularbiologischen und serologischen Arbeiten und ihre stets sehr engagierte Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Hermanns vom Institut für Tierpathologie danke ich für die Bereitstellung der Schweinestallungen.

Allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Veterinärbakteriologie in Zürich und der II. Medizinischen Tierklinik in München sei gedankt für Ihr freundschaftliches Entgegenkommen, die Einweisung in und Unterstützung bei verschiedenen Arbeiten im Labor und Stall.

Bei meinen Freundinnen und Kolleginnen Frau Dr. Stephanie Speck und Frau Dr. Barbara Litzenberger möchte ich mich ganz herzlich für die unzähligen Stunden, die sie mir und meiner Doktorarbeit vor allem in der Endphase gewidmet haben, bedanken. Danke für die wunderbare Freundschaft in all den Jahren.

Grossen Dank schulde ich Herrn Roland Christoph für die allzeit prompte und geduldige Unterstützung bei Computerproblemen, vor allem bei der „Rettung“ meiner Arbeit in der Endphase der Doktorarbeit.

Meinen Eltern, kann ich nicht genug für die liebevolle Unterstützung über all die Jahre danken. Mein ganz besonderer Dank gebührt meinem Freund Nik für seine unentbehrliche Unterstützung und unendliche Geduld in dieser Zeit.

Lebenslauf

Name: Petra Fischer
Geburtsdatum: 05.05.1972
Geburtsort: Wolfratshausen
Nationalität: Deutsch

1978–1982 Grundschule Geretsried, D
1982–1991 Gymnasium Geretsried, D
Abschluss 1991: Abitur

1991–1998 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
München, D

Abschluss 1998: Staatsexamen

1998 Approbation

1998–1999 Beginn des Promotionsstudiums an der II. Medizinischen
Tierklinik, Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines der
Ludwig-Maximilians-Universität München, D

1999–2003 Promotionsstudium am Institut für Veterinärbakteriologie
der Universität Zürich

seit 2001 Tierärztliche Klinik Dr. Krieger-Huber, Neuburg am Inn, D

26. Juli 2003